

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 10 月 31 日 (31.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/086119 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, A01K 67/04, C12N 9/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04906

(22) 国際出願日: 2001 年 6 月 11 日 (11.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-120155 2001 年 4 月 18 日 (18.04.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本

町4丁目1番8号 Saitama (JP). 財団法人 広島県産業技
術振興機構 (HIROSHIMA INDUSTRIAL TECHNOL-
OGY ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒730-0052 広島県広
島市中区千田町3丁目7番47号 Hiroshima (JP). テルモ
株式会社 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP];
〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号 Tokyo
(JP). 株式会社 高研 (KOKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
171-0031 東京都豊島区目白3-14-3 Tokyo (JP). 独立
行政法人 農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTI-
TUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP];
〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉里勝利
(YOSHIZATO, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒739-0144 広島
県東広島市八本松南7-22-13 Hiroshima (JP). 富田
正浩 (Tomita, Masahiro) [JP/JP]; 〒739-0025 広島県

[続葉有]

(54) Title: TRANSFORMED SILKWORM PRODUCING HUMAN COLLAGEN

(54) 発明の名称: ヒト・コラーゲンを産生する形質転換カイコ

(57) Abstract: A transformed silkworm which has a polynucleotide encoding human collagen in its genomic DNA and produces recombinant human collagen as a part of proteins in its cocoon or silk gland; a process for producing human collagen by using this transformed silkworm; and a recombinant vector to be used in the constitution of the transformed silkworm. Since human collagen is collected from the cocoon discharged by this transformed silkworm or its silk gland, highly pure human collagen can be conveniently obtained in a large amount. Moreover, the recombinant human collagen produced by the transformed silkworm is a highly safe collagen which is free from any fear of the contamination with pathogens such as viruses or prions and shows no antigenicity on humans. Thus, it is usable in various industrial fields including medicines, foods and cosmetics.

(57) 要約:

この発明は、ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドをゲノム DNA 内に有し、組換えヒト・コラーゲンを繭または絹糸腺内のタンパク質の一部として産生する形質転換カイコと、この形質転換カイコを用いて組換えヒト・コラーゲンを製造する方法、並びに形質転換カイコの作成に使用される組換えベクターを提供する。この形質転換カイコの吐き出す繭または絹糸腺からヒト・コラーゲンを回収するため、簡便に高純度のヒト・コラーゲンを大量に得ることが可能となる。また、形質転換カイコの産生する組換えヒト・コラーゲンは、ウイルスやプリオン等の病原体混入の危険性がなく、ヒトに対する抗原性もない安全なコラーゲンであるため、医療、食品、化粧品等の様々な産業分野で利用することができる。

WO 02/086119 A1



東広島市西条中央5-1-19 Hiroshima (JP). 佐藤 勉 (SATO, Tsutomu) [JP/JP]; 〒739-0025 広島県東広島市西条中央7-21-36 Hiroshima (JP). 森 肇 (MORI, Hajime) [JP/JP]; 〒603-8131 京都府京都市北区小山内河原町27-1 Kyoto (JP). 田村俊樹 (TAMURA, Toshiki) [JP/JP]; 〒305-0851 茨城県つくば市大わし1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 安達敬泰 (ADACHI, Takahiro) [JP/JP]; 〒739-0044 広島県東広島市西条町下見4215-1 Hiroshima (JP). 宗綱洋人 (MUNETSUNA, Hiroto) [JP/JP]; 〒739-0041 広島県東広島市西条町寺家1956-E103 Hiroshima (JP).

(74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

ヒト・コラーゲンを産生する形質転換カイコ

5

技術分野

この出願の発明は、組換えヒト・コラーゲンを産生する形質転換カイコに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、組換えヒト・コラーゲンを
10 産生する形質転換カイコと、この形質転換カイコを作製するための組換えベクター、並びに組換えヒト・コラーゲンの製造方法に関するものである。

背景技術

15

コラーゲンは細胞外基質を構成する代表的タンパク質であり、細胞の足場とな
って生体の構造を維持するといった機械的機能の他、細胞の増殖、分化、移動な
どを制御する様々な生理的機能を有している。そのためコラーゲンは生体の損傷
を修復するためのバイオマテリアルとして（J.Surg.Res. 10:485-491, 1970）、
20 またある種の薬剤を徐放するためのキャリアーとして（J.Controlled Release
33:307-315, 1995）、医療分野で広く利用されている。しかし、現在用いられて
いるコラーゲンの大部分はウシやブタ等の動物組織由来のものであり、これらの
コラーゲンをヒトに移植した場合、約3%の患者にアレルギー反応が生じること
が知られている（J.Immunol.136:877-882, 1986；Biomaterials 11:176-180,
25 1990）。また、動物組織由来コラーゲンにおけるウイルスやプリオン等病原体混
入の危険性は近年大きな問題となっている。そのため抗原性が無く、また病原体
混入の危険性が無い組換え型ヒト・コラーゲンを生産するシステムが望まれてい
る。そこで、この出願の発明者らは、ヒト・コラーゲンをコードする cDNA を挿

入した組換えウイルスを昆虫細胞に感染させることにより、ヒト生体内のものと同等な三重らせん構造を有する組換えヒト・コラーゲンを製造する方法を発明し、特許出願している（特開平 8-23979 号公報）。また、哺乳動物細胞や酵母を用いてヒト・コラーゲンを製造する方法も考案されている（特表平 7-501937 公報）。

5

前記のとおり、組換えヒト・コラーゲンを生産する方法として、昆虫細胞、哺乳動物細胞、酵母を用いる方法等が考案されているが、昆虫細胞や哺乳動物細胞を用いる方法では医療分野で用いることが可能なほどの高い生産量を上げることは難しい。また、酵母を用いる方法は、組換え産物が菌体内に産生されるため、

10 組換えヒト・コラーゲンの精製は必ずしも容易ではない。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、高い生産性と精製の容易さを兼ね備えた組換えヒト・コラーゲン生産法と、そのための遺伝子工学材料を提供することを課題としている。

15

発明の開示

この出願の第 1 の発明は、ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドをゲノム DNA 内に有し、組換えヒト・コラーゲンを繭または絹糸腺内のタンパク質の一部として産生する形質転換カイコである。

この出願の第 2 の発明は、ヒト・コラーゲンとカイコ絹タンパク質との融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドをゲノム DNA 内に有し、前記融合タンパク質を繭または絹糸腺内のタンパク質の一部として産生する形質転換カイコである。

25

これらの第 1 発明および第 2 発明の形質転換カイコには、カイコ成虫、幼虫、

蛹および卵が含まれる。

また、これら第 1 発明および第 2 発明の形質転換カイコにおいては、プロリン水酸化酵素 α サブユニットおよび β サブユニットの少なくとも一方をコードする
5 ポリヌクレオチドをゲノム DNA 内に有することを好ましい態様としている。

この出願の第 3 の発明は、前記第 1 発明の形質転換カイコの繭または絹糸腺から組換えヒト・コラーゲンを単離、精製することを特徴とする組換えヒト・コラーゲンの製造方法である。

10

この出願の第 4 発明は、前記第 2 発明の形質転換カイコの繭または絹糸腺から組換えヒト・コラーゲンとカイコ絹タンパク質との融合タンパク質を単離し、この融合タンパク質から組換えヒト・コラーゲンを分離、精製することを特徴とする組換えヒト・コラーゲンの製造方法である。

15

この出願の第 5 発明は、前記第 2 発明の形質転換カイコが産生する組換えヒト・コラーゲンとカイコ絹タンパク質との融合タンパク質である。

この出願の第 6 の発明は *Autographa californica* 核多角体ウイルス由来のター
20 ゲティングベクターであり、このベクターは、ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドをカイコ・ゲノムの任意領域と相同組換えし、ヒト・コラーゲンを産生する形質転換カイコを作成するために使用する。なお、この出願の発明において、「ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチド」とは、コラーゲンを発現するヒト核酸分子であり、ヒト・ゲノム DNA、ゲノム DNA から転写され
25 る mRNA、mRNA から合成される cDNA 等である。

この第 6 発明のターゲティングベクターの 1 つの態様は、ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドの両端に、カイコ絹タンパク質をコードするゲノム

DNA（カイコ絹タンパク質遺伝子）の任意領域と相同の DNA 配列を有することである。このターゲティングベクターは、ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを、カイコ・ゲノムの絹タンパク質遺伝子の（すなわち、内在性の）発現制御配列（プロモーター／エンハンサー配列）の下流に相同組換えする。

5

この第6発明のターゲティングベクターの別の態様は、ヒト・コラーゲン発現カセットの両端に、カイコ・ゲノム DNA の任意領域と相同の DNA 配列を有することである。このターゲティングベクターは、ヒト・コラーゲン発現カセットを、カイコ・ゲノムの任意領域に相同組換えする。なお、この「発現カセット」とは、
10 カイコ絹タンパク質遺伝子の発現制御配列の支配下にヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドが連結された融合ポリヌクレオチドを意味する。

この出願の第7の発明は、プロリン水酸化酵素 α サブユニットおよび β サブユニットの少なくとも一方をコードするポリヌクレオチドをカイコ・ゲノムの任意
15 領域と相同組換えするための、*Autographa californica* 核多角体ウイルス由来のターゲティングベクターである。

この出願の第8の発明は、昆虫由来 DNA 型トランスポソンの一対の逆向き反復配列に挟まれた領域に、ヒト・コラーゲン発現カセットを有する組換えプラス
20 ミドベクターである。

この出願の第9の発明は、昆虫由来 DNA 型トランスポソンの一対の逆向き反復配列に挟まれた領域に、プロリン水酸化酵素 α サブユニットおよび β サブユニットの少なくとも一方をコードするポリヌクレオチドを有する組換えプラスミド
25 ベクターである。

この出願の第10の発明は、前記第8発明の組換えプラスミドベクターと、トランスポソンのトランスポゼースをコードするポリヌクレオチドを有する組換え

プラスミドベクターとからなるベクターセットである。このベクターセットの使用によって、ヒト・コラーゲン発現カセットがカイコ・ゲノムに転移され、ヒト・コラーゲンを産生する形質転換カイコが作成される。

- 5 この出願の第 11 の発明は、前記第 9 発明の組換えプラスミドベクターと、トランスポゾンのトランスポゼースをコードするポリヌクレオチドを有する組換えプラスミドベクターとからなるベクターセットである。この第 11 発明のベクターセットと、前記第 10 発明のベクターセットとの使用によって、プロリンが水酸化されたヒト・コラーゲンを産生する形質転換カイコが作成される。

10

この出願の第 12 の発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するカイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードするポリヌクレオチドであり、具体的には、配列番号 1 の塩基配列を有する DNA 断片である。

- 15 なお、この出願の各発明においては、プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 の塩基配列を有する DNA 断片の少なくともコード領域であることを好ましい態様としている。また、ヒト・コラーゲン発現カセットが、カイコ絹タンパク質遺伝子の発現制御配列の支配下にヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを連結した融合ポリヌクレオチドであること、またはカイコ絹タンパク質遺伝子の発現制御配列の支配下に、カイコ絹タンパク質をコードするポリヌクレオチドとヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを連結した融合ポリヌクレオチドであることを好ましい態様としている。

25

図面の簡単な説明

図 1 は、トランスラファーベクター pMOSRA-1 の制限酵素地図である。

図 2 は、piggyBac プラスミドベクターに組み込まれたミニコラーゲン遺伝子 (pMOSRA-4B, pMOSRA-5, pMOSRA-6) の制限酵素地図である。

- 5 図 3 は、陽性 F1 カイコ成虫から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、その増幅産物の電気泳動像を示す図である。1 および 2 は陽性カイコの番号を表す。レーン M は 100bp ラダーマーカーである。

- 10 図 4 は、陽性 F1 カイコ 5 齢幼虫の絹糸腺から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行い、その増幅産物の電気泳動像を示す図である。レーン 1 および 2 には陽性カイコの RT-PCR 産物を、レーン C には野生型カイコの RT-PCR 産物を泳動した。レーン M は 100bp ラダーマーカーである。

15 発明を実施するための最良の形態

- コラーゲンには現在までに I 型から XIX 型までの 19 種の異なった型のものが存在することが知られている。これらのコラーゲンはいずれも 3 つのサブユニット (α 鎖) から形成される三量体分子で、その分子内に三重らせん構造をもつことが特徴である。コラーゲンの中には、先ず前駆体であるプロコラーゲンとして合成された後、成熟型のコラーゲン分子に変換されるものがある。例えば I、II、III 型コラーゲン等の線維性コラーゲンは、その本体である三重らせん領域のアミノ末端側およびカルボキシル末端側に非三重らせん構造のアミノプロペプチドおよびカルボキシルプロペプチドを有したプロコラーゲンとして合成され、両方の
- 20 プロペプチドが特異的なプロテアーゼにより切断された後、成熟したコラーゲンとなる。また、コラーゲンはその生合成過程で、プロリンの水酸化、リジンの水酸化、リジンおよび水酸化リジンの酸化 (アルデヒド化) 等を含む様々な翻訳後修飾を受ける。特にプロリン水酸化酵素によるプロリンの水酸化は、コラーゲン
- 25

が生理的温度での安定性を獲得する上で非常に重要である。

この出願の発明が対象とするヒト・コラーゲンは、I型からXIX型コラーゲンを
含むすべてのコラーゲンであり、これらコラーゲンの部分アミノ酸配列も含む。

- 5 また、これらコラーゲンのアミノ酸配列の一部分を改変したものや、コラーゲン
に由来しないアミノ酸配列を付加したものも含む。また、成熟したコラーゲンに
加え、前駆体であるプロコラーゲンやプロペプチドの一部が切断されたもの含
む。さらに、この出願の発明では、プロリンの水酸化を含む翻訳後修飾が不完全
であったり、三重らせん構造が不完全である未成熟なコラーゲン分子も対象とす
10 る。

- カイコは吐糸期にはいると、大量の絹糸を吐き出して繭を作る。この絹糸の主
成分はフィブロイン、P25 およびセリシンを含む絹タンパク質であり、これら絹
タンパク質の合成量は1頭のカイコあたり平均で約0.5gにも達するほど莫大で
15 ある。絹タンパク質は絹糸腺と呼ばれる器官で合成される。絹糸腺は後部絹糸腺、
中部絹糸腺および前部絹糸腺より構成され、後部絹糸腺ではフィブロインおよび
P25が、中部絹糸腺ではセリシンがそれぞれ特異的に合成・分泌される。フィブ
ロインはH鎖およびL鎖から構成される複合体で、さらにこの複合体にP25が
会合している(J. Biol. Chem. 275:40517-40528, 2000)。後部絹糸腺から分泌さ
20 れたフィブロインおよびP25は、絹糸腺の蠕動運動によって徐々に中部絹糸腺
へと送られ、そこで分泌されたセリシンによって周りを被覆され、さらに前部絹
糸腺へと送られ絹糸として吐糸される。このように、カイコ絹糸腺は優れたタン
パク質合成能力を有した器官であり、この器官で組換えヒト・コラーゲンを発現
させた場合、非常に高い生産性が期待できる。さらに、絹糸は体外に排出される
25 こと、絹糸を構成する絹タンパク質の種類が少ないこと、および絹タンパク質の
中で最も存在量の多いフィブロインは水溶液に不溶性であることから、合成され
た組換えヒト・コラーゲンをカイコが吐き出した繭から、または絹糸腺内のタン
パク質から回収および精製することは著しく容易である。

カイコにおける一過性の外来遺伝子発現システムはカイコ核多角体ウイルス (BmNPV) をベクターとして利用する方法が確立されている (特公平 7-97995 号公報)。しかし、この方法ではウイルスの感染によりカイコは致死するため、
5 次世代以降に外来遺伝子を伝達することはできず、有用タンパク質の発現は一代限りである。そのため、外来遺伝子を発現させる度にウイルス接種を行う必要がある。一方、森らは *Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) をカイコ幼虫に感染させることにより、カイコを致死させることなく遺伝子を導入し、メスに感染させた場合には生殖細胞を通じて次世代まで外来遺伝子を伝達すること
10 が可能な方法を開発した (特開平 6-277051 号公報)。さらに、山尾らはフィブロイン L 鎖遺伝子配列の一部を組み込んだ AcNPV をカイコ幼虫に感染させ、遺伝子ターゲティングにより外来遺伝子をカイコゲノムのフィブロイン L 鎖遺伝子に挿入した形質転換カイコを作製することに成功している (Genes Dev. 13: 511-516, 1999)。

15

また、田村ら (Nat. Biotechnol. 18:81-84, 2000) は、鱗翅目昆虫 *Trichoplusia ni* に由来する DNA 型トランスポゾンである piggyBac を組み込んだプラスミドベクターをカイコ卵に微量注射することにより、外来遺伝子を挿入した形質転換カイコを作製することに成功している。

20

これらの方法で作出された形質転換カイコにおいて、挿入された外来遺伝子は脱落することなく染色体内に維持され、世代を通じて永続的に組換えタンパク質を発現する。

25

この出願の発明では、ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを AcNPV ベクターへ、または DNA 型トランスポゾンをもとに作製したプラスミドベクターへ組み込み、これらのベクターを用いてカイコ・ゲノム配列内にヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを挿入した形質転換カイコを作製する。

ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドは、ヒト・コラーゲンのゲノム DNA、mRNA または mRNA から合成した cDNA 等を用いることができるが、好ましくは cDNA を使用する。以下では、cDNA を使用した場合について主に説明するが、この発明に使用するポリヌクレオチドは cDNA に限定されるものではない。

ヒト・コラーゲン cDNA は I 型から XIX 型コラーゲンのいずれの cDNA であってもよい。これらの cDNA の塩基配列は文献（例えば、Essays Biochem. 27:49-67, 1992 ; Annu.Rev. Biochem. 64:403-434, 1995）に記載された情報から入手可能である。例えば、これらの cDNA 配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとしてヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法や、あるいは cDNA 配列の両端に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとし、ヒトの遺伝子を鋳型とする PCR 法、またはヒト細胞から抽出した RNA を鋳型とする RT-PCR 法によって、ヒト I 型～XIX 型コラーゲンの各 cDNA を得ることができる。

カイコ絹糸腺細胞にてヒト・コラーゲン cDNA を発現させるために、フィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖、P25 およびセリシンを含む絹タンパク質遺伝子由来の発現制御配列（プロモーターおよびエンハンサー）を利用することができる。これら絹タンパク質のプロモーターおよびエンハンサーを利用して発現カセットを構築することにより、組換えヒト・コラーゲンを絹糸腺特異的に大量に発現させることができる。例えば、フィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖、P25 のプロモーターおよびエンハンサーを利用すれば、ヒト・コラーゲンを後部絹糸腺で発現させることができ、セリシンのプロモーターおよびエンハンサーを利用すれば、ヒト・コラーゲンを中部絹糸腺で発現させることができる。ヒト・コラーゲン発現カセットはまた、絹糸腺細胞からの分泌や吐糸を容易にするために、ヒト・コラーゲン cDNA とフィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖、P25 および

セリシンを含む絹タンパク質 cDNA との融合ポリヌクレオチドを作製し、この融合ポリヌクレオチドをカイコ・ゲノム配列内に組み込むことにより、ヒト・コラーゲンとカイコ絹タンパク質の融合タンパク質を合成させても良い。この場合、融合させるタンパク質は絹タンパク質の部分アミノ酸配列であっても良いし、全長アミノ酸配列であっても良い。例えば、ヒト・コラーゲンのシグナルペプチドを絹タンパク質のシグナルペプチドと置換した融合タンパク質を合成させれば、ヒト・コラーゲンの絹糸腺細胞からの分泌を容易にすることができる。また、例えばフィブロイン L 鎖全長とヒト・コラーゲンの融合タンパク質を合成させれば、合成されたフィブロイン L 鎖とヒト・コラーゲンの融合タンパク質は、フィブロイン H 鎖とジスルフィド結合により複合体を形成し、より効率良く分泌させることができる。

遺伝子導入系が AcNPV ベクターを用いた遺伝子ターゲティング法である場合、ヒト・コラーゲン cDNA を定法により AcNPV ゲノム DNA 内に組み込んでターゲティングベクターを構築し、これをカイコ幼虫に感染させることにより、相同組換えによりカイコ・ゲノム DNA 内にヒト・コラーゲン cDNA を組み込むことができる。相同組換えによりヒト・コラーゲン cDNA を組み込む部位は、例えばフィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖、P25 およびセリシンを含む絹タンパク質遺伝子内であっても良いし、あるいは絹タンパク質遺伝子以外の任意のゲノム DNA 領域であっても良い。

組み込み部位が絹タンパク質遺伝子内の場合は、その絹タンパク質遺伝子内の 2 箇所の任意領域と相同の DNA 配列を、それぞれヒト・コラーゲン cDNA の前後に連結して AcNPV ターゲティングベクターを構築する。このターゲティングベクターの感染によって、カイコ内在性の発現制御配列の下流にヒト・コラーゲン cDNA が組み込まれ、内在性絹タンパク質プロモーター／エンハンサーの作用によって cDNA からヒト・コラーゲンが発現される。またこの場合、ヒト・コラーゲン cDNA と絹タンパク質との融合タンパク質が合成されるように、ヒト・コ

ラーゲン cDNA を絹タンパク質遺伝子内に組み込むこともできる。例えば、フィ
ブロイン L 鎖遺伝子第 7 エクソン内の終始コドン直前にアミノ酸フレームが一続
きになるようにヒト・コラーゲン cDNA を組み込み、フィブロイン L 鎖とヒト・
コラーゲンの融合タンパク質を合成させることができる。この場合の AcNPV ベ
5 クター内には、コラーゲン cDNA の前後に、フィブロイン L 鎖第 7 エクソンから
上流および下流のゲノム DNA と相同の DNA 配列をそれぞれ 0.5 kb~6.0 kb 程度
挿入する。

また、絹タンパク質遺伝子以外の任意のゲノム DNA 配列内にヒト・コラーゲ
ン cDNA を相同組換えする場合には、ヒト・コラーゲン cDNA の上流に絹タンパ
ク質遺伝子プロモーターを連結したヒト・コラーゲン発現カセットを作製する。
そして発現カセットを相同組換えするカイコ・ゲノム DNA 領域から上流および
下流のそれぞれ 0.5 kb~6.0 kb 程度に相同の DNA 配列を発現カセットの前後に
連結し、これを AcNPV ベクターに組み込んでターゲティングベクターを構築す
15 る。相同組換え部位が絹タンパク質遺伝子内の場合、および絹タンパク質遺伝子
以外の任意のゲノム配列のどちらの場合でも、ヒト・コラーゲン cDNA と共にマ
ーカー遺伝子を同時に組み込み、次世代 (F1) さらに次の世代 (F2) での形質
転換カイコの選抜を容易にさせることも可能である。マーカー遺伝子としては、
例えば GFP 等の蛍光タンパク質遺伝子を挙げることができ、また、マーカー遺
20 伝子を発現させるためのプロモーターとしては、例えばカイコ・アクチンプロモ
ーターやショウジョウバエ HSP70 プロモーター等を挙げることができる。

ヒト・コラーゲン cDNA を組み込んだ形質転換カイコを作製するための別の態
様は、昆虫由来 DNA 型トランスポゾンを利用した形質転換である。piggyBac、
25 mariner (Insect Mol. Biol. 9: 145-155, 2000)、および Minos (Insect Mol. Biol.
9: 277-281, 2000) 等の昆虫由来 DNA 型トランスポゾンは、カイコ細胞内で転移
活性を示すことが知られており、これらの DNA 型トランスポゾンをもとに作製
したプラスミドベクターによりカイコを形質転換させることが可能である。特に

- piggyBac をもとに作製したプラスミドベクターは、カイコ卵に微量注入することにより、実際にカイコを形質転換させることに成功している (Nat. Biotechnol. 18: 81-84, 2000)。昆虫由来 DNA 型トランスポゾンを利用する場合、外来遺伝子はカイコ・ゲノム内の任意の配列に組み込まれる。従って、カイコ・ゲノム配列内に組み込んだヒト・コラーゲン cDNA を絹糸腺にて発現させるために、あらかじめヒト・コラーゲン cDNA の上流にフィブロイン H 鎖、フィブロイン L 鎖、P25 およびセリシンを含む絹タンパク質遺伝子由来のプロモーターおよびエンハンサーを連結したヒト・コラーゲン発現カセットを作製しておく必要がある。
- 10 また、ヒト・コラーゲンと絹タンパク質の融合ポリヌクレオチドを組み込む場合には、この融合ポリヌクレオチドの上流に絹タンパク質遺伝子由来のプロモーターおよびエンハンサーを連結した発現カセットを作製しておく。以下に piggyBac を例に挙げて、その性質およびヒト・コラーゲン発現カセットを導入する方法を説明するが、この発明で使用する昆虫由来 DNA 型トランスポゾンは
- 15 piggyBac に限定するものではなく、mariner および Minos を含む他の DNA 型トランスポゾンを使用しても良い。これら piggyBac 以外のトランスポゾンを用いた場合のヒト・コラーゲン発現カセットを導入する方法は、以下に記した piggyBac を用いた方法と基本的に同様である。
- 20 piggyBac は、鱗翅目昆虫 *Trichoplusia ni* 由来の培養細胞である TN-368 から単離された DNA 型トランスポゾンである。中央部にあるトランスポゼース ORF と、その両端に存在する 13 bp の逆向き反復配列から構成されており、長さは約 2.5 kb である。トランスポゼース ORF からはトランスポゼースタンパク質が合成され、この酵素の作用により、逆向き反復配列にはさまれた領域 (piggyBac 自体)
- 25 体を標的配列である TTAA に転移させる (Virology 161: 8-17, 1989)。このような piggyBac の性質を利用してカイコ・ゲノム配列内にヒト・コラーゲン発現カセットを挿入するには、例えば田村らの方法 (Nat. Biotechnol. 18: 81-84, 2000) と同様な方法によって行うことができる。即ち、piggyBac の一対の逆向

き反復配列を適当なプラスミドベクターに組み込み、ヒト・コラーゲン発現カセットを一对の逆向き反復配列で夾むように挿入する。そしてこのプラスミドベクターを、piggyBac のトランスポゼース発現ベクター（ヘルパープラスミド）と共にカイコ卵へ微量注入する。このヘルパープラスミドは、piggyBac の逆向き反

5 復配列の片方または両方を欠いた、実質的には piggyBac のトランスポゼース遺伝子領域のみが組み込まれている組換えプラスミドベクターである。このヘルパープラスミドにおいて、トランスポゼースを発現させるためのプロモーターは、

10 内在性のトランスポゼースプロモーターをそのまま利用しても良いし、あるいは、カイコ・アクチンプロモーターやショウジョウバエ HSP70 プロモーター等を利用してよい。次世代カイコのスクリーニングを容易にするために、コラーゲン発現カセットを組み込んだベクター内に同時にマーカー遺伝子を組み込んでおくこともできる。この場合、マーカー遺伝子の上流に例えばカイコ・アクチンプロモーターやショウジョウバエ HSP70 プロモーター等のプロモーター配列を組み込み、その作用によりマーカー遺伝子が発現させるようにする。

15

F1 世代のカイコからの、および AcNPV ベクターを用いた場合はさらに F2 世代のカイコからの形質転換カイコの選抜は、例えば PCR 法やサザンブロット法を用いて行う。また、マーカー遺伝子を組み込んだ場合には、その表現形質を利用して選抜することも可能である。例えばマーカー遺伝子として GFP 等の蛍光タンパク質遺伝子を利用した場合には、F1 や F2 世代のカイコ卵や幼虫に励起光を照射し、蛍光タンパク質の発する蛍光を検出することにより行うことができる。

20 このようにして選抜されたカイコは、その染色体内にヒト・コラーゲン cDNA が組み込まれている形質転換カイコである。従って、これらのカイコを野生型カイコと、あるいは形質転換カイコどうしで交配させた子孫においてもヒト・コラー

25 ゲン cDNA は消失することなく伝達され、世代を通じてヒト・コラーゲンまたはコラーゲンと絹タンパク質との融合タンパク質を産生させることができる。

上記のヒト・コラーゲンを産生する形質転換カイコに、さらにプロリン水酸化

酵素をコードするポリヌクレオチドを絹糸腺で発現しうる形態で導入すれば、生理的温度において完全に熱安定なヒト・コラーゲンを生産させることができる。導入するプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチド（例えば cDNA）は、ヒトや他の動物に由来するポリヌクレオチドであっても良いし、カイコ由来のプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドでも良い。プロリン水酸化酵素は α サブユニットと β サブユニットの複合体であり、この複合体を形成しなければ酵素活性は生じない。 α サブユニットは触媒活性を有するサブユニットであり、本来コラーゲンを産生する細胞に存在する。一方、 β サブユニットはタンパク質のジスルフィド結合の構造変換を触媒する酵素であるプロテインジスルフィドイソメラーゼと同一のポリペプチドであり、全ての細胞に普遍的にかつ比較的多量に存在する。カイコ絹糸腺細胞は、コラーゲンを多量に産生する細胞ではないので α サブユニットの存在量はわずかであるが、 β サブユニットは比較的多量に存在する。カイコにプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを導入し、カイコ絹糸腺にてプロリン水酸化酵素を発現させるには、上記のようにヒト等の動物由来のプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを用いる方法と、カイコのプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを用いる方法がある。ヒト等動物由来のプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを用いる場合、 α サブユニットおよび β サブユニットのそれぞれをコードする2種類のポリヌクレオチドが必要である。昆虫の β サブユニットはヒト等動物由来の α サブユニットとほとんど活性型の複合体を形成しないため、ヒト等動物由来の α サブユニットの発現のみでは活性型の酵素を合成させることができない。一方、カイコのプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを用いる場合は、 α サブユニットのものだけでよい。絹糸腺にて発現する α サブユニットは、比較的多量に存在する内在性の β サブユニットと活性型の複合体を形成することができるからである。

この出願は、カイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニット（配列番号2）をコードする新規なポリヌクレオチドを提供する。このポリヌクレオチドは、配列番号1の塩基配列を有する cDNA、およびゲノム DNA から単離・精製された DNA 断片および RNA 断片である。ゲノム DNA 断片や RNA 断片は、配列番号1の塩

基配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチド等を用いたスクリーニングや PCR によって得ることができる。

- プロリン水酸化酵素をコードするポリヌクレオチドをカイコ染色体内に導入してカイコ絹糸腺で酵素を発現させるためには、絹糸腺で遺伝子を発現させることが可能なプロモーターを利用する。この条件を満たすプロモーターとしては、例えば絹糸腺だけで遺伝子を発現させることができるフィブロイン、P25、およびセリシンを含む絹タンパク質のプロモーターや、どの組織でも発現可能なプロモーターであるカイコ・アクチン、ショウジョウバエ HSP70、AcNPV の IE1 等の
- 10 プロモーターを挙げることができる。プロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドをカイコ染色体に導入するには、前記のヒト・コラーゲン cDNA を導入するための方法と同様な方法、即ち、AcNPV を用いた遺伝子ターゲティング法あるいは、piggyBac 等の DNA 型トランスポゾン
- 15 を基に作製したプラスミドベクターをカイコ卵にマイクロインジェクションする方法によって行うことができる。ヒト・コラーゲンとプロリン水酸化酵素の両方のポリヌクレオチドを有するカイコを作製するためには、ヒト・コラーゲン ポリヌクレオチドを有する形質転換カイコにプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを導入しても良いし、逆にプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを有する形質転換カイコにヒト・コラーゲン ポリヌクレオチドを導入しても良い。あるいは、ヒト・コラーゲン ポリヌクレオチドのみ
- 20 を有する形質転換カイコと、プロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを有する形質転換カイコを別々に作製し、これらを交配させることによって、両方のポリヌクレオチドを有する形質転換カイコを選抜しても良い。なお、AcNPV ベクターによって両方のポリヌクレオチドをそれぞれ導入し、あるいは DNA 型トランスポゾンベクターによって両方のポリヌクレオチドをそれぞれに導入することができ
- 25 るが、AcNPV ターゲティングベクターを用いてヒト・コラーゲン ポリヌクレオチドを導入し、DNA トランスポゾン型のプラスミドベクターを用いてプロリン水酸化酵素ポリヌクレオチドを導入してもよく、あるいはその逆であってもよい。

ヒト・コラーゲン cDNA を有する形質転換カイコは、5 齢期に達すると、内在性の絹タンパク質と共にヒト・コラーゲンを合成し、絹糸の一部として繭中にヒト・コラーゲンを分泌する。繭中のヒト・コラーゲンは例えば 0.5M 酢酸等によって簡単に抽出することができる。また、例えばヒト・コラーゲンをカイコ・フィブロイン L 鎖との融合タンパク質として合成させた場合には、還元状態にすることにより融合タンパク質とフィブロイン H 鎖間のジスルフィド結合を切断し抽出することができる。また、繭中に含まれるヒト・コラーゲンが線維性コラーゲンであり、三重らせん領域部分（アテロコラーゲン）のみを精製する場合には、繭のタンパク質をペプシン等のタンパク質分解酵素で処理する。この操作によりタンパク質分解酵素で消化されることのないアテロコラーゲンが抽出でき、かつ他の多くのタンパク質はペプシンの消化を受けるため、その後の精製を容易に行うことができる。また、ヒト・コラーゲンを形質転換カイコの絹糸腺から繭の場合と同様の方法で抽出・精製することもきる。絹糸腺はカイコを解剖することにより簡単に分離することができ、含まれるタンパク質のほとんどが絹タンパク質であるため、繭の場合同様、容易にヒト・コラーゲンを抽出・精製することが可能である。

実施例

以下に、ヒトⅢ型コラーゲンの製造方法に関する実施例を挙げてこの出願の発明をより具体的に説明するが、この出願の発明はこの例に限定されるものではない。

実施例 1

AcNPV ベクターを用いた遺伝子ターゲティング法による
形質転換カイコの作製

ヒトⅢ型プロコラーゲンをコードする cDNA は、この出願の発明者らがクローニングした cDNA (特開平 8-23979 号公報 : GeneBank データベース登録番号 X14420) を、また、カイコ・フィブロイン L 鎖遺伝子およびその下流のカイコ・ゲノム DNA 配列は、既知のカイコ・フィブロイン L 鎖遺伝子の塩基配列 (Gene 100:151-158, 1992 : GeneBank データベース登録番号 M76430) を基に以下の方法で単離した。

なお、以下の記載において、ヒトⅢ型プロコラーゲン cDNA およびカイコ・フィブロイン L 鎖遺伝子の塩基番号は、前記 GeneBank データベースに記載されている塩基番号に準じている。

(1) カイコ・フィブロイン L 鎖遺伝子およびその下流域ゲノム DNA 配列の単離
PCR 法を用いてフィブロイン L 鎖イントロン 6 内の遺伝子断片の増幅を行った。PCR プライマーは、前記データベースの配列を基に合成したオリゴヌクレオチド (配列番号 3 および配列番号 4) を用い、鋳型にはカイコ tokai x asahi strain のゲノム DNA を使用した。次いで、得られた DNA 断片をプローブに用いて、λEMBL3 により構築されているカイコ kinshu x showa strain ゲノムライブラリーを定法に従いスクリーニングした。その結果フィブロイン L 鎖遺伝子の塩基番号 9600 から下流に約 15kb の領域を含んでいるカイコ・ゲノム DNA 断片 (pRI/10k) を得た。

(2) 部位特異的突然変異導入による制限酵素認識配列の作製

フィブロイン L 鎖遺伝子エクソン 7 内にⅢ型プロコラーゲン cDNA を繋ぐため、部位特異的突然変異導入によりフィブロイン遺伝子に新たな制限酵素サイトを設けた。突然変異導入はクロンテック社の Mutagenests Kit を使用した。突然変異導入用プライマー (配列番号 5) はフィブロイン L 鎖遺伝子エクソン 7 のストップコドン直前に制限酵素 Xho I 部位 (配列番号 5 の位置 8-12) を設けるように

設計した。鋳型プラスミドには、pRI/10k から EcoRI-SphI 断片（塩基番号 12000-14800）を pUC18 にサブクローニングしたもの（pRISphI/2.9k）を使用した（Mut pRISphI-XhoI）。同様に、フィブロイン L 鎖遺伝子下流領域フラグメント（塩基番号 14200-18900）を挿入するため、突然変異導入により XbaI 部位を新たに設けた。突然変異導入用プライマー（配列番号 6）はフィブロイン L 鎖遺伝子エクソン 7 のストップコドン直前に XbaI 部位（配列番号 6 の位置 12-17）を設けるように設計した。鋳型プラスミドには、先と同様の pRISphI/2.9k を使用した（Mut pRISphI-XhoI）。

- 10 III 型プロコラーゲン cDNA のアミノプロペプチドをコードする塩基配列内にも、上記同様の部位特異的突然変異法を用いて制限酵素 XhoI のサイトを導入した。突然変異導入用プライマー（配列番号 7）の塩基配列は III 型プロコラーゲン cDNA の塩基番号 292 から 324 に対応し、制限酵素 XhoI 部位（配列番号 7 の位置 17-22）が挿入されている。

15 (3) トランスファーベクターの構築

- クロンテック社のバキュロウイルストランスファーベクター pBacPAK9 を制限酵素 SmaI および EcoRI で消化し、pCaSepR-hsp（GeneBank 登録番号 U59056）から切り出したショウジョウバエ HSP70 プロモーターと EGFP cDNA（クロンテック）を連結した DNA フラグメント（EcoRV-EcoRI）をライゲーションした後、大腸菌 DH5α にトランスフォームした（pBacPAKhsEGFP）。ライゲーションは TaKaRa 社 Ligation Kit Ver. 1 を使用し、トランスフォーメーション等は定法に従い行った。

- 25 先に完成したミュータントプラスミド Mut pRISphI-XhoI からインサート配列のフラグメント（EcoRV-XhoI）を切り出し、III 型プロコラーゲン cDNA の XhoI 部位（突然変異導入により構築）に連結した。続いて PCR によって pCEP4（インビトロジェン）より増幅した SV40 polyA 付加シグナル配列をコラーゲン cDNA の下流（BglII 部位）に挿入した。そして、完成したフィブロイン・コラーゲン・polyA 付加シグナル配列フラグメント（EcoRV-BglII）を

pBacPAKhsEGFP の EcoRV-BglII 部位に連結した。次にフィブロインL鎖遺伝子のイントロン2の一部～エクソン7の一部（塩基番号約 10000-13100）を EcoRV 部位に挿入した（pBacPAKhsEGFP-Fib1）。

- 続いてミュータントプラスミド Mut pRISphI-XbaI からインサート配列のフラグメント EcoRV-SphI 1.7kbp（塩基番号約 13100-14800）を切り出し、pRI/10k の SmaI-SphI（部分消化によって）部位に挿入した。完成した Mut RI/10k から切り出した XbaI 消化フラグメント（フィブロイン遺伝子エクソン7の一部およびその下流域／塩基番号約 14200-18900）を pBacPAKhsEGFP-Fib1 に挿入した（pMOSRA-1：図1）。

10

(4) 組換えウイルスの作製

- 作製したターゲティングベクターpMOSRA-1 とバキュロウイルス DNA をヨトウガ培養細胞 Sf9 にコ・トランスフェクションすることにより組換えウイルスの作製を行った。pMOSRA-1 0.4 μ g/ μ l を 7 μ l、線状バキュロウイルス DNA (Pharmingen) 0.1 μ g/ μ l を 1 μ l にリポフェクチン (Gibco) 4 μ l、水 4 μ l を加え良く混合した後、無血清培地 SF900-II (Gibco) に置き換えた Sf9 細胞 1×10^6 cells の上に滴下し培養した。24 時間後 10%血清入り Grace 培地を 1 ml 添加してさらに3日間培養した後培養上清を回収した。

20 (5) 組換えウイルスのスクリーニングおよび純化

- 1×10^6 個の Sf9 細胞に上記のウイルス液 100 μ l を加え、28 $^{\circ}$ Cで1時間感染させた。上清を除き、1%低沸点アガロース溶液（SEAPLAQUE, FMC）を含む Grace 培地 1 ml を加え固化させた。培養3日後、生じたプラークに波長 360 nm の励起光を照射し、緑色蛍光を発しているプラーク、すなわち EGFP を発現している細胞のプラークを 10 個、寒天ごと切り出した。次にこれらのプラークから回収した組換えウイルスを再び 1×10^6 個の Sf9 細胞に感染させ、細胞内の DNA を抽出し、ドットプロットを行った。プローブにはフィブロインL鎖遺伝子を認識するプローブとプロコラーゲン cDNA を認識するプローブの2種類を用いた。

25

その結果、4つのプラークに由来するウイルスクローンが陽性であった。次にこれら陽性ウイルスを 1×10^6 個の Sf9 細胞に感染させ、3日後に培養上清を回収した。培養上清中のウイルスを同様にして再び Sf9 細胞に感染させ、高力価のウイルスストックを得た。

5

(6) 組換えバキュロウイルスのカイコ5齢幼虫への感染

カイコ5齢1日目のメス幼虫に 50 μ l のウイルス液 (5×10^6 pfu) を皮下注射した。接種した幼虫が踊化してから3~4日目にメタノールに溶解した 20-hydroxyecdysone (2 mg/ml) を 10 μ l 投与した。羽化後、正常カイコガのオスと
10 交配させ、産卵させた。

(7) F1 カイコのスクリーニング

1頭のメスカイコが生んだ F1 卵 (100~300 粒) を1グループとし、各グループから約 50 粒の卵をサンプリングし、残りの卵については飼育を続けた。サン
15 プリングした卵から定法により DNA を抽出し PCR 法により外来遺伝子の有無を判定した。PCR は、プライマーセット (配列番号 8 および 9) を用いて SV40 polyA 付加シグナルを検出するように、またはプライマーセット (配列番号 10 および 11) を用いて HSP70 プロモーターを検出するように行った。

合計 1800 グループの卵をスクリーニングした結果、15 グループが陽性であり、
20 これらのグループの残りの卵を孵化させ、孵化した F1 幼虫を5齢まで飼育した。5齢3日目に各幼虫より約 100 μ l の体液を採取し、これらの体液から遠心操作により体液細胞を分離し、DNA を抽出した後、PCR 法によりスクリーニングを行った。合計 3400 匹の5齢幼虫をスクリーニングした結果、8匹が陽性であった。これらのカイコは飼育を続け、羽化したカイコガを正常カイコガと交配させ産卵
25 させた。

(8) F2 カイコのスクリーニング

F2 カイコのスクリーニングは緑色蛍光により行った。1齢幼虫期に波長 360

nm の励起光をあて、EGFP の緑色蛍光を発する個体、すなわちマーカー遺伝子として挿入した EGFP を発現している個体を選別した。8 グループの F2 卵をスクリーニングした結果、2 匹の陽性カイコを得ることが出来た。

5 (9) 組換えヒトコラーゲンの検出

陽性 F2 カイコを吐糸期まで飼育し、繭中のタンパク質を SDS-サンプル緩衝液 (0.125M トリス塩酸緩衝液、pH 6.8 / 4% SDS / 10% 2-メルカプトエタノール / 20% グリセロール) を加えて混合し 5 分間 100℃ で熱処理することにより抽出した。この試料を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Nature 10 227:680-685, 1970) に供し、Matudaira らの方法 (J. Biol. Chem. 261:10035-10038, 1987) に準じて、泳動されたタンパク質をニトロセルロース膜 BA 85 (S & S 社) に転写した。次に、タンパク質が転写されたニトロセルロース膜をブロッキング液 (3% BSA / 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 / 150 mM NaCl) で 4℃ において 16 時間処理した後、ブロッキング液で 200 倍に希釈した抗ヒト 15 /ウシⅢ型コラーゲン抗体と室温で 1 時間反応させた。これらの抗体が反応するタンパク質をベクタステイン ABC キット (ベクターラボラトリー社) で検出した。その結果、繭中からヒトⅢ型コラーゲンを検出した。

20

実施例 2

piggyBac ベクターの卵への微量注入法による 形質転換カイコの作製

25 (1) piggyBac プラスミドベクターの作製

ヒトⅢ型プロコラーゲン cDNA (塩基番号 92-4550: GeneBank データベース登録番号 X14420) を XhoI で消化し塩基番号 1075-3545 の領域を取り除いた後、切断末端をセルフライゲーションにより繋ぐことにより、ミニⅢ型コラーゲン

cDNA を作製した。このミニコラーゲン cDNA は、アミノプロペプチド、三重らせん領域の一部（全長コラーゲン三重らせん領域の約 1/5）、およびカルボキシルプロペプチドをコードする塩基配列から構成されるものであり、これをもとにして、以下の 3 種類のベクターを構築した。

5

i) pMOSRA-4B

このベクターに含まれるインサート DNA 断片は、カイコ・セリシンプロモーター、ミニコラーゲン cDNA、およびカイコ・フィブロイン L 鎖 polyA 付加シグナルより構成される。カイコ・セリシンプロモーター（塩基番号 1299-1622 :
10 GeneBank データベース登録番号 AB007831) を 5'末端に BglII 切断配列を付加したプライマー（配列番号 12) およびプライマー（配列番号 13) を用いたカイコ・ゲノム DNA を鋳型とする PCR によって単離し、これをミニコラーゲン cDNA 上流に連結した。また、カイコ・フィブロイン L 鎖 polyA 付加シグナル（塩基番号 14141-14624 : GeneBank データベース登録番号 M76430) をプライマー（配列番号 14) および 5'末端に BglII 切断配列を付加したプライマー（配
15 列番号 15) を用いたカイコ・ゲノム DNA を鋳型とする PCR によって単離し、ミニコラーゲン cDNA の下流に連結した（図 2)。このようにして得られたインサート DNA 断片の両末端を BglII で切断し、さらに切断末端を T4DNA ポリメラーゼで平滑化した後、XhoI で切断した後切断末端を平滑化した pPIGA3GFP ベ
20 クター（Nat. Biotechnol. 18: 81-84, 2000) に挿入した。なお、pPIGA3GFP ベクターには、マーカーとしての EGFP cDNA とこの cDNA を発現させるためのカイコ・アクチン（A3) プロモーターが組み込まれている。

ii) pMOSRA-5

25 このベクターに含まれるインサート DNA 断片は、カイコ・フィブロイン L 鎖プロモーター、カイコ・フィブロイン L 鎖シグナルペプチド cDNA、ミニコラーゲン cDNA、およびカイコ・フィブロイン L 鎖 polyA 付加シグナルより構成される。カイコ・フィブロイン L 鎖シグナルペプチド cDNA（塩基番号 28-160 :

GeneBank データベース登録番号 X17291) をプライマー (配列番号 16) および 5'末端に XhoI 切断配列を組み込んだプライマー (配列番号 17) を用いたカイコ絹糸腺由来 cDNA を鋳型とする PCR によって単離した。また、実施例 1 (2) に記した方法と同様にして、プロコラーゲンアミノプロペプチドをコードする領域内に XhoI 切断配列を導入し、cDNA 5'末端からこの XhoI 切断部位までの領域を、
5 フィブロイン L 鎖シグナルペプチド cDNA と置換した。さらに、カイコ・フィブロイン L 鎖プロモーター (塩基番号 428-1061 : GeneBank データベース登録番号 M76430) を 5'末端に XbaI および BglII 切断配列を付加したプライマー (配列番号 18) およびプライマー (配列番号 19) を用いたカイコ・ゲノム DNA を鋳型とする PCR によって単離した後、これをカイコ・フィブロイン L 鎖シグナルペプチド cDNA の上流に連結し、また、カイコ・フィブロイン L 鎖 polyA 付加シグナルをミニコラーゲン cDNA の下流に連結した (図 2)。このようにして得られたインサート DNA 断片の両末端を BglII で切断し、さらに切断末端を T4DNA ポリメラーゼで平滑化した後、XhoI で切断した後切断末端を平滑化した
10 pPIGA3GFP ベクターに挿入した。
15

III) pMOSRA-6

このベクターに含まれるインサート DNA 断片は、カイコ・フィブロイン L 鎖プロモーター、カイコ・フィブロイン L 鎖全長 cDNA、ミニコラーゲン cDNA、
20 およびカイコ・フィブロイン L 鎖 polyA 付加シグナルより構成される。カイコ・フィブロイン L 鎖全長 cDNA (塩基番号 30-820 : GeneBank データベース登録番号 X17291) は、プライマー (配列番号 20) および 5'末端に XhoI 切断配列を組み込んだプライマー (配列番号 21) を用いたカイコ絹糸腺由来 cDNA を鋳型とする PCR によって単離した。次にこの cDNA を、pMOSRA-5 の場合と同様に
25 して、ミニコラーゲン cDNA の 5'末端からアミノプロペプチド内に導入した XhoI 切断部位までの領域と置換した。さらに、カイコ・フィブロイン L 鎖 cDNA の上流にカイコ・フィブロイン L 鎖プロモーターを、ミニコラーゲン cDNA の下流にカイコ・フィブロイン L 鎖 polyA 付加シグナルを連結した (図 2)。このよ

うにして得られたインサート DNA 断片の両末端を XbaI で切断し、さらに切断末端を T4DNA ポリメラーゼで平滑化した後、XhoI で切断した後切断末端を平滑化した pPIGA3GFP ベクターに挿入した。

5 (2) プラスミドベクターのカイコ卵への微量注入

上記の 3 種類のミニコラーゲンベクター (pMOSRA-4B, pMOSRA-5, pMOSRA-6) を塩化セシウム超遠心法で精製した後、この 3 種類のベクターとヘルパープラスミドである pHA3PIG (Nat. Biotechnol. 18: 81-84, 2000) を混合し、さらにエタノール沈殿を行った後、ミニコラーゲンベクターそれぞれの濃度が
10 66.7 µg/ml (合計で 200 µg/ml)、pHA3PIG の濃度が 200 µg/ml なるようにインジェクションバッファー (0.5 mM リン酸バッファー pH 7.0, 5 mM KCl) に溶解した。この DNA 溶液を、産卵後 2 ~ 8 時間の前胚盤葉期のカイコ卵 (カイコ胚) に、一つの卵あたり約 15~20 nl の液量で微量注入した。合計 1078 個の卵に微量注入を行った。

15

(3) F1 幼虫のスクリーニング

ベクター DNA を微量注入した卵を 25°C でインキュベートしたところ 518 個の卵が孵化した。孵化したカイコの飼育を続け、413 頭の生殖可能な成虫が得られたためこれらを交配し、213 グループの F1 卵塊を得た。次に、これら F1 卵を孵
20 化させ、孵化した幼虫をグループ毎に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、26 グループから緑色蛍光を発する幼虫を得ることができた。陽性グループに含まれる陽性カイコの数、1 グループあたり 1 頭~30 頭であり、これらを合計すると
240 頭であった。これら陽性 F1 カイコを飼育し野生型カイコと交配させ、さらに次の世代 (F2) カイコを得た。F2 カイコのうち約 1/2 のカイコは緑色蛍光を
25 発しており、組み込まれた EGFP およびミニコラーゲン遺伝子は、脱落することなく、メンデルの法則に従って次世代へ伝達されることが確認された。さらに、産卵後の F1 カイコ成虫からゲノム DNA を抽出し、プライマーセット (配列番号 22 および 23) を用いた PCR によりミニコラーゲン DNA 断片を、またプライマ

ーセット（配列番号 24 および 25）を用いた PCR により EGFP 断片を増幅したところ、緑色蛍光を発する陽性カイコからミニコラーゲンおよび EGFP DNA 断片を検出することができた（図 3）。さらにサザンブロット解析を行い、これら外来遺伝子がカイコ・ゲノム DNA 内に組み込まれていることを確認した。

5

(4) ミニコラーゲン mRNA および組換えミニコラーゲンの検出

5 齢期に達した陽性 F1 幼虫を解剖して絹糸腺を取りだし、酸グアニジンフェノールクロロホルム法により total RNA を抽出し、そのうちの 200 ng 分の RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型とし PCR を 94°C1 分、60°C1 分、72°C1 分の反応条件で 30 サイクル行った（RT-PCR）。プライマーは、上記のプライマーセット（配列番号 22 および 23）を用いた。その結果、ミニコラーゲン mRNA を検出することができ、カイコ・ゲノム DNA に組み込まれたミニコラーゲン遺伝子が、絹糸腺細胞内で発現していることが確かめられた（図 4）。

次に、組換えミニコラーゲタンパク質の検出を試みた。陽性 F1 カイコを吐糸期まで飼育し、吐き出した繭中のタンパク質を SDS-サンプル緩衝液（0.125M トリス塩酸緩衝液、pH 6.8／4 % SDS／10% 2-メルカプトエタノール／20%グリセロール）を加えて混合し 5 分間 100°C で熱処理することにより抽出した。この試料を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Nature 227:680-685, 1970）に供し、Matudaira らの方法（J. Biol. Chem. 261:10035-10038, 1987）に準じて、泳動されたタンパク質をニトロセルロース膜 BA85（S&S 社）に転写した。次に、タンパク質が転写されたニトロセルロース膜をブロッキング液（3 % BSA／50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.5／150 mM NaCl）で 4 °C において 16 時間処理した後、ブロッキング液で 200 倍に希釈した抗ヒト／ウシⅢ型コラーゲン抗体と室温で 1 時間反応させた。これらの抗体が反応するタンパク質をベクタステイン ABC キット（ベクターラボラトリー社）で検出した。その結果、繭中から組換えミニコラーゲタンパク質を検出することが出来た。

実施例 3

カイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニット cDNA
のクローニング

5

まず、混合プライマーを用いた degenerate PCR 法によって、カイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニット cDNA の部分配列をクローニングした。すでに報告されているヒト、ショウジョウバエ、および線虫のプロリン水酸化酵素 α サブユニット遺伝子のアミノ酸配列を比較し、種間で保存されている領域をもとに、アミノ酸配列から推定される塩基配列をもつ混合プライマー P3 (配列番号 26)、P5II (配列番号 27) を設計した。なお、混合プライマー配列中、n は a、c、g または t、r は a または g、y は c または t、s は c または g、w は a または t であることを示す。続いて PCR の鋳型とするため、カイコ培養細胞である BmN4 細胞とカイコ 2 齢幼虫からそれぞれ total RNA を抽出した。そのうちの 200 ng 分の RNA を逆転写して得られた cDNA を鋳型とし PCR を 94°C 1 分、58°C 1 分、72°C 1 分の反応条件で 40 サイクル行った。その結果、BmN4 細胞とカイコ 2 齢幼虫ともに電気泳動で約 150bp の増幅産物が確認でき、その増幅産物をインビトロジェン社 pCR2.1 にサブクローニングし、ジデオキシ法によって塩基配列を決定したところ、この cDNA 断片は塩基配列レベル、そこから予想されるアミノ酸配列レベルともに他動物のプロリン水酸化酵素 α サブユニットと高い相同性をもち、カイコ・プロリン水酸化酵素 cDNA の部分断片であることが明らかになった。

続いて、全長 cDNA をクローニングするため、得られたカイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニット cDNA 断片の上流、下流を RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) 法によって単離した。cDNA 断片の塩基配列から 5'RACE 用プライマー GSP1 (配列番号 28)、3'RACE 用プライマー GSP2 (配列番号 29) を設計した。RACE はクロンテック社 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit を使用して行った。RACE の結果、電気泳動で、5'領域約 1.7kb、3'領域約 1.2kb の cDNA 断片を確認することができた。これらの cDNA 断片を上記同様にサブクロ

ーニングし、その塩基配列を解析したところ、カイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードする配列を全て含んでいた。得られた全長 cDNA の塩基配列を配列番号 1 に、この cDNA がコードするカイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニットのアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

5

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、組換えヒト・コラーゲンを繭または絹糸腺に含まれるタンパク質の一部として生産する形質転換カイコと、このカイコが生産する組換えヒト・コラーゲンが提供される。組換えヒト・コラーゲンは、形質転換カイコの吐き出す繭または絹糸腺から回収するため、抽出しやすく、純度の高いコラーゲンを容易に得ることができる。また、形質転換カイコの生産する組換えヒト・コラーゲンは、ウイルスやプリオン等の病原体混入の危険が無く、またヒトに対して抗原性の無い安全ヒト・コラーゲンであるため、医療、食品、化粧品等の様々な産業分野で利用することが可能である。

請求の範囲

1. ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドをゲノム DNA 内に有し、
組換えヒト・コラーゲンを繭または絹糸腺内のタンパク質の一部として産生する
5 形質転換カイコ。
2. プロリン水酸化酵素 α サブユニットおよび β サブユニットの少なくとも一
方をコードするポリヌクレオチドを、さらにゲノム DNA 内に有する請求項 1 の
形質転換カイコ。
10
3. プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードするポリヌクレオチドが、配
列番号 1 の塩基配列を有する DNA 断片の少なくともコード領域である請求項 2
の形質転換カイコ。
- 15 4. ヒト・コラーゲンとカイコ絹タンパク質との融合タンパク質をコードする
ポリヌクレオチドをゲノム DNA 内に有し、前記融合タンパク質を繭または絹糸
腺内のタンパク質の一部として産生する形質転換カイコ。
5. プロリン水酸化酵素 α サブユニットおよび β サブユニットの少なくとも一
20 方をコードするポリヌクレオチドをさらにゲノム DNA 内に有する請求項 4 の形
質転換カイコ。
6. プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードするポリヌクレオチドが、配
列番号 1 の塩基配列を有する DNA 断片の少なくともコード領域である請求項 5
25 の形質転換カイコ。
7. 請求項 1、2 または 3 の形質転換カイコの繭または絹糸腺から組換えヒ
ト・コラーゲンを単離、精製することを特徴とする組換えヒト・コラーゲンの製

造方法。

8. 請求項 4、5 または 6 の形質転換カイコの繭または絹糸腺から組換えヒト・コラーゲンとカイコ絹タンパク質との融合タンパク質を単離し、この融合タンパク質から組換えヒト・コラーゲンを分離、精製することを特徴とする組換えヒト・コラーゲンの製造方法。

9. 請求項 4、5 または 6 の形質転換カイコが産生する組換えヒト・コラーゲンとカイコ絹タンパク質との融合タンパク質。

10

10. ヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを有する、*Autographa californica* 核多角体ウイルス由来のターゲティングベクター。

11. ポリヌクレオチドがヒト・コラーゲン発現カセットである請求項 10 のターゲティングベクター。

15

12. ヒト・コラーゲン発現カセットが、カイコ絹タンパク質遺伝子の発現制御配列の支配下にヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを連結した融合ポリヌクレオチドである請求項 11 のターゲティングベクター。

20

13. ヒト・コラーゲン発現カセットが、カイコ絹タンパク質遺伝子の発現制御配列の支配下に、カイコ絹タンパク質をコードするポリヌクレオチドとヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを連結した融合ポリヌクレオチドである請求項 11 のターゲティングベクター。

25

14. プロリン水酸化酵素 α サブユニットおよび β サブユニットの少なくとも一方をコードするポリヌクレオチドを有する、*Autographa californica* 核多角体ウイルス由来のターゲティングベクター。

15. プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 の塩基配列を有する DNA 断片の少なくともコード領域である請求項 14 のターゲティングベクター。

5

16. 昆虫由来 DNA 型トランスポゾンの一対の逆向き反復配列に挟まれた領域に、ヒト・コラーゲン発現カセットを有する組換えプラスミドベクター。

10 17. ヒト・コラーゲン発現カセットが、カイコ絹タンパク質遺伝子の発現制御配列の支配下にヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを連結した融合ポリヌクレオチドである請求項 16 の組換えプラスミドベクター。

15 18. ヒト・コラーゲン発現カセットが、カイコ絹タンパク質遺伝子の発現制御配列の支配下に、カイコ絹タンパク質をコードするポリヌクレオチドとヒト・コラーゲンをコードするポリヌクレオチドを連結した融合ポリヌクレオチドである請求項 16 の組換えプラスミドベクター。

20 19. 昆虫由来 DNA 型トランスポゾンの一対の逆向き反復配列に挟まれた領域に、プロリン水酸化酵素 α サブユニットおよび β サブユニットの少なくとも一方をコードするポリヌクレオチドを有する組換えプラスミドベクター。

20. プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードするポリヌクレオチドが、配列番号 1 の塩基配列を有する DNA 断片の少なくともコード領域である請求項 19 の組換えプラスミドベクター。

25

21. 請求項 16、17 または 18 の組換えプラスミドベクターと、トランスポゾンのトランスポゼースをコードするポリヌクレオチドを有する組換えプラスミドベクターとからなるベクターセット。

22. 請求項 19 または 20 の組換えプラスミドベクターと、トランスポゾンのトランスポゼースをコードするポリヌクレオチドを有する組換えプラスミドベクターとからなるベクターセット。

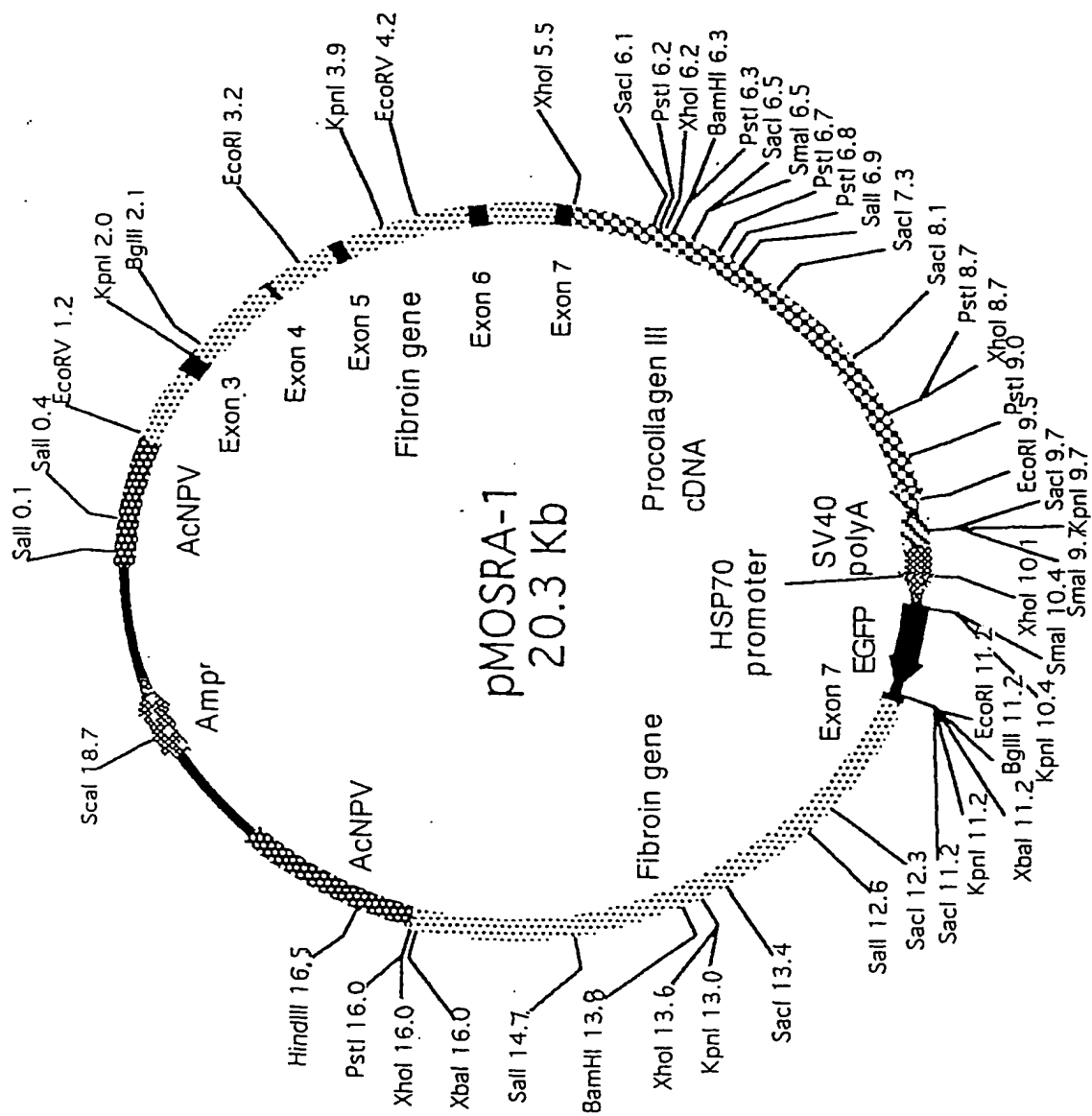
5

23. 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するカイコ・プロリン水酸化酵素 α サブユニットをコードするポリヌクレオチド。

24. 配列番号 1 の塩基配列を有する DNA 断片である請求項 23 のポリヌクレ
10 オチド。

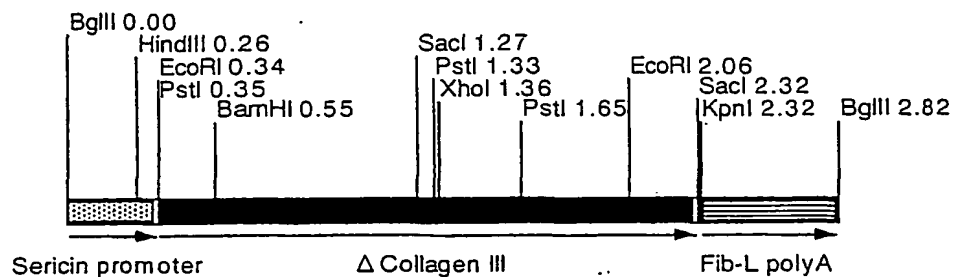
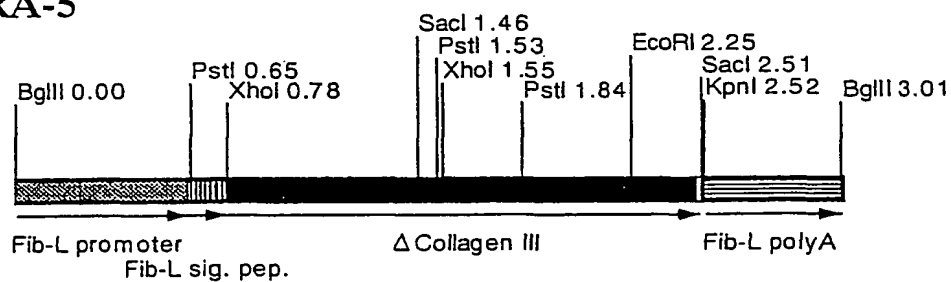
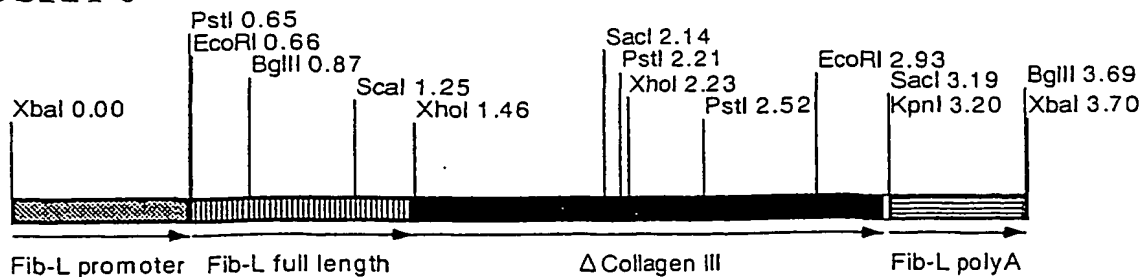
1/4

図 1



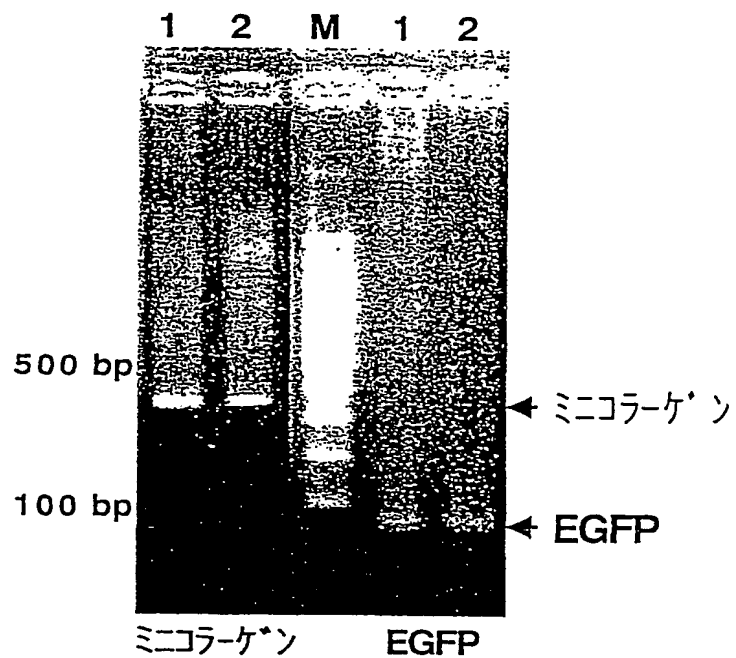
2/4

2

pMOSRA-4B**pMOSRA-5****pMOSRA-6**

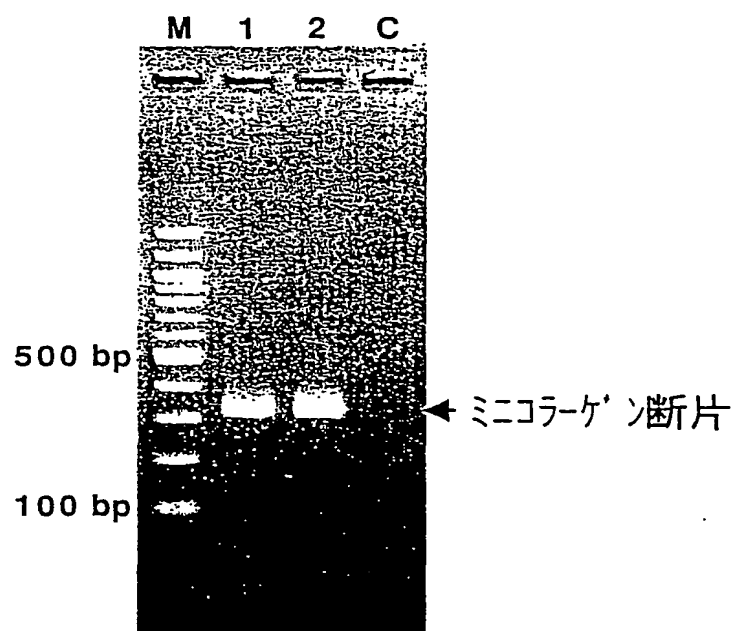
3/4

図 3



4/4

図 4



SEQUENCE LISTING

- <110> Japan Science and Technology Corporation;
Hiroshima Industrial Technology Organization;
TERUMO CORPORATION;
TOKEN Co., Ltd. ; and
National Institute of Agrobiological Sciences
- <120> A Transformed Silkworm producing Human Collagen
- <130> 01-F-027PCT
- <140>
- <141>
- <150> JP2000-361563
- <151> 2000-11-28
- <160> 29
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 2483
- <212> DNA
- <213> Bombyx mori
- <220>

<221> CDS

<222> (228).. (1880)

<400> 1

tacgcggggg aaccgaccga cgtcgggctg cgtggacgca cgtatctttg ccagattgtc 60

gctttattta acgtttataa ttgtgaattg attgcaattc aatttgttgt gaatgaggtt 120

aaactgcaat acgtttttct aataatcctt aatgatgtac gttgtctgt aaaacaattt 180

gctgatctgc aagtctaga atcgttttca tatttatttc tgcaaaa atg gaa aca 236

Met Glu Thr

1

gta aga gcg ata gct ttt ttg ctt ctg ttt ttc ttt act tgg gcc aaa 284

Val Arg Ala Ile Ala Phe Leu Leu Leu Phe Phe Phe Thr Trp Ala Lys

5

10

15

gca gag cta ttc aca gcc ata acg gat gtt gaa ccg cta ctg gaa acc 332

Ala Glu Leu Phe Thr Ala Ile Thr Asp Val Glu Pro Leu Leu Glu Thr

20

25

30

35

cac aag agg atc ata gac gat tta gat gat tac ctg caa aaa gaa gag 380

His Lys Arg Ile Ile Asp Asp Leu Asp Asp Tyr Leu Gln Lys Glu Glu

40

45

50

agg aga ctt ttc act ttg aag aaa cac ttg aat tta tat aaa agg gaa 428

Arg Arg Leu Phe Thr Leu Lys Lys His Leu Asn Leu Tyr Lys Arg Glu

3/22

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 55 | 60 | 65 | |
| cac gaa agg gct atg gat gac atc cct aac tac ctc ggc aac ccg atc 476 | | | |
| His Glu Arg Ala Met Asp Asp Ile Pro Asn Tyr Leu Gly Asn Pro Ile | | | |
| 70 | 75 | 80 | |
| aat gct ttc acg ttg ata aaa aga tta acg gcc gac ctt gat ttt ata 524 | | | |
| Asn Ala Phe Thr Leu Ile Lys Arg Leu Thr Ala Asp Leu Asp Phe Ile | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| gag gat agc att aaa att gga aca gaa tac ata aag aac gtc aca atg 572 | | | |
| Glu Asp Ser Ile Lys Ile Gly Thr Glu Tyr Ile Lys Asn Val Thr Met | | | |
| 100 | 105 | 110 | 115 |
| aac cac gtg gac gtg aaa tat ccg tca ttg gaa gat ctg acg gga gca 620 | | | |
| Asn His Val Asp Val Lys Tyr Pro Ser Leu Glu Asp Leu Thr Gly Ala | | | |
| 120 | 125 | 130 | |
| gct cag gcg ctg act cgg ttg cag gaa acc tac tat tta aat gta cac 668 | | | |
| Ala Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu Thr Tyr Tyr Leu Asn Val His | | | |
| 135 | 140 | 145 | |
| gat cta gcc gag ggt ata ttg aat gga gtt tca tac agt act cct atg 716 | | | |
| Asp Leu Ala Glu Gly Ile Leu Asn Gly Val Ser Tyr Ser Thr Pro Met | | | |
| 150 | 155 | 160 | |
| acg gcg agc gat tgt tac gaa ctc ggc cgg act cta tac aac gat aaa 764 | | | |
| Thr Ala Ser Asp Cys Tyr Glu Leu Gly Arg Thr Leu Tyr Asn Asp Lys | | | |

4/22

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 165 | 170 | 175 | |
| gat tac aca aac gcc ttg gcc tgg atg aaa gaa gcg cta agg aaa tat 812 | | | |
| Asp Tyr Thr Asn Ala Leu Ala Trp Met Lys Glu Ala Leu Arg Lys Tyr | | | |
| 180 | 185 | 190 | 195 |
| aaa gat gaa aac gtc atg tac ccg ttc acc gaa gtc gat atc ttg gaa 860 | | | |
| Lys Asp Glu Asn Val Met Tyr Pro Phe Thr Glu Val Asp Ile Leu Glu | | | |
| | 200 | 205 | 210 |
| tat ata gga ttc gca tat tat tta aac gga gac gtc aaa acc gct ctg 908 | | | |
| Tyr Ile Gly Phe Ala Tyr Tyr Leu Asn Gly Asp Val Lys Thr Ala Leu | | | |
| | 215 | 220 | 225 |
| gaa tgg act cag aga ctt ctg tcc gtc gat ccg aag cac gta cga gcg 956 | | | |
| Glu Trp Thr Gln Arg Leu Leu Ser Val Asp Pro Lys His Val Arg Ala | | | |
| | 230 | 235 | 240 |
| cgg ggc aac ata ccg cac tat cag aag acg ata gcc gaa caa gag gcc 1004 | | | |
| Arg Gly Asn Ile Pro His Tyr Gln Lys Thr Ile Ala Glu Gln Glu Ala | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| gaa tta aag aag caa caa cgt ggg gaa acc tcg gat gag cct gaa gaa 1052 | | | |
| Glu Leu Lys Lys Gln Gln Arg Gly Glu Thr Ser Asp Glu Pro Glu Glu | | | |
| 260 | 265 | 270 | 275 |
| gaa gat ggt caa gat tac gaa tta tca gag tac gca aag gaa cgc aaa 1100 | | | |
| Glu Asp Gly Gln Asp Tyr Glu Leu Ser Glu Tyr Ala Lys Glu Arg Lys | | | |

5/22

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 280 | 285 | 290 | |
| gtt tac gaa tcg ctg tgt cgg gga gaa atg gaa ata ccc cat gag att | | | 1148 |
| Val Tyr Glu Ser Leu Cys Arg Gly Glu Met Glu Ile Pro His Glu Ile | | | |
| 295 | 300 | 305 | |
| act aag agg ttg aaa tgt tgg tac gtc acc gac acg cat ccg ttt tta | | | 1196 |
| Thr Lys Arg Leu Lys Cys Trp Tyr Val Thr Asp Thr His Pro Phe Leu | | | |
| 310 | 315 | 320 | |
| aag ttg gcc cca atc aaa gtg gag cag atg tac gtg aag ccc gac ata | | | 1244 |
| Lys Leu Ala Pro Ile Lys Val Glu Gln Met Tyr Val Lys Pro Asp Ile | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| ttt atg ttc cac gaa gtg atg acc gac gac gag att gag ttc atc aaa | | | 1292 |
| Phe Met Phe His Glu Val Met Thr Asp Asp Glu Ile Glu Phe Ile Lys | | | |
| 340 | 345 | 350 | 355 |
| aaa cga gca aag ccg agg ttc aaa cgg gct gtc gtt cac gac cct aaa | | | 1340 |
| Lys Arg Ala Lys Pro Arg Phe Lys Arg Ala Val Val His Asp Pro Lys | | | |
| 360 | 365 | 370 | |
| act ggt gag ctg aca ccg gcc cat tac cgc atc agc aag tcg tcg tgg | | | 1388 |
| Thr Gly Glu Leu Thr Pro Ala His Tyr Arg Ile Ser Lys Ser Ser Trp | | | |
| 375 | 380 | 385 | |
| ctc cgc gac gag gag tct ccg gtc ata gcg cgc atc acg cag cgc gtc | | | 1436 |
| Leu Arg Asp Glu Glu Ser Pro Val Ile Ala Arg Ile Thr Gln Arg Val | | | |

6/22

| 390 | 395 | 400 | |
|---|-----|-----|------|
| acc gac atg acc ggg ctc agc atg ctg cac gcc gag gag ctt cag gtc | | | 1484 |
| Thr Asp Met Thr Gly Leu Ser Met Leu His Ala Glu Glu Leu Gln Val | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| gtc aac tac ggc ata ggg gga cac tac gaa ccg cac ttc gac ttc gct | | | 1532 |
| Val Asn Tyr Gly Ile Gly Gly His Tyr Glu Pro His Phe Asp Phe Ala | | | |
| 420 | 425 | 430 | 435 |
| agg aaa cgt gag aat cca ttc acg aaa ttc ggc ggc aac aga ata gcc | | | 1580 |
| Arg Lys Arg Glu Asn Pro Phe Thr Lys Phe Gly Gly Asn Arg Ile Ala | | | |
| 440 | 445 | 450 | |
| acc gtc ctc ttc tac atg tct gac gtg gcg cag ggc ggc gct aca gtg | | | 1628 |
| Thr Val Leu Phe Tyr Met Ser Asp Val Ala Gln Gly Gly Ala Thr Val | | | |
| 455 | 460 | 465 | |
| ttc acc gaa ctt gga ctc agt ttg ttt cca ata aaa cga gct gcg gcg | | | 1676 |
| Phe Thr Glu Leu Gly Leu Ser Leu Phe Pro Ile Lys Arg Ala Ala Ala | | | |
| 470 | 475 | 480 | |
| ttc tgg ttg aac ctg cac gcg tcg ggc gaa gga gac ctc gcc acc agg | | | 1724 |
| Phe Trp Leu Asn Leu His Ala Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Thr Arg | | | |
| 485 | 490 | 495 | |
| cat gcc gcc tgc ccc gtg ctc agg gga tcc aag tgg gtg tca aat aaa | | | 1772 |
| His Ala Ala Cys Pro Val Leu Arg Gly Ser Lys Trp Val Ser Asn Lys | | | |

7/22

500 505 510 515

tgg ata cat caa ggc ggg caa gag ctg ttg agg ccc tgc gac ctt gag 1820
Trp Ile His Gln Gly Gly Gln Glu Leu Leu Arg Pro Cys Asp Leu Glu

520 525 530

tac cag gag gag ggc atc atc cgc aag att cct cgt cca gtg ccg aag 1868
Tyr Gln Glu Glu Gly Ile Ile Arg Lys Ile Pro Arg Pro Val Pro Lys

535 540 545

aca tcc agg tag actccgagca acgtgtgacc gaacggaact gatcataaat 1920
Thr Ser Arg

550

tggttcggtat agtgcatttt ttttttaaatt aaaatagatt aaatattaca tagtataata 1980

gaatgttggg tctgtgtagt acacgtattc gacttctgtg tctcgtgcga ttttacgaat 2040

aaccacaagc ataatcgact agaatgcata atttttaatt agttatgggt caagaaagaa 2100

gatttctatt atgaaagacg ccaagaaaat tacgccaaact aacttttagg agatgtttta 2160

aataaccaat aatttgagtg caatttatac tatactttta atatatttat taaattgttc 2220

caatttcttt actttcccct atttagaacg tatagtttaa gttaacgttg atttgtttga 2280

ttgtaaaata ttaacagtaa actcacacca ggcacacaca aaaaaccatc tattgtttgcg 2340

8/22

aacaaattca caaataaaca tatctaataa aaaaaaatgt taaataataa ataagttgca 2400

atgaaacact aatatatttt aacatattat atattatagt gatattcttag aataaaccat 2460

cgtaggctcga tggctcgtgg cta 2483

<210> 2

<211> 550

<212> PRT

<213> Bombyx mori

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Thr | Val | Arg | Ala | Ile | Ala | Phe | Leu | Leu | Leu | Phe | Phe | Phe | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Trp | Ala | Lys | Ala | Glu | Leu | Phe | Thr | Ala | Ile | Thr | Asp | Val | Glu | Pro | Leu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Leu | Glu | Thr | His | Lys | Arg | Ile | Ile | Asp | Asp | Leu | Asp | Asp | Tyr | Leu | Gln |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | |
| Lys | Glu | Glu | Arg | Arg | Leu | Phe | Thr | Leu | Lys | Lys | His | Leu | Asn | Leu | Tyr |
| | | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | |
| Lys | Arg | Glu | His | Glu | Arg | Ala | Met | Asp | Asp | Ile | Pro | Asn | Tyr | Leu | Gly |
| | | | 65 | | | 70 | | | | 75 | | | | 80 | |
| Asn | Pro | Ile | Asn | Ala | Phe | Thr | Leu | Ile | Lys | Arg | Leu | Thr | Ala | Asp | Leu |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Asp | Phe | Ile | Glu | Asp | Ser | Ile | Lys | Ile | Gly | Thr | Glu | Tyr | Ile | Lys | Asn |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Val | Thr | Met | Asn | His | Val | Asp | Val | Lys | Tyr | Pro | Ser | Leu | Glu | Asp | Leu |

9/22

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 | |
| Thr Gly Ala Ala Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu Thr Tyr Tyr Leu | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Asn Val His Asp Leu Ala Glu Gly Ile Leu Asn Gly Val Ser Tyr Ser | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr Pro Met Thr Ala Ser Asp Cys Tyr Glu Leu Gly Arg Thr Leu Tyr | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Asn Asp Lys Asp Tyr Thr Asn Ala Leu Ala Trp Met Lys Glu Ala Leu | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Arg Lys Tyr Lys Asp Glu Asn Val Met Tyr Pro Phe Thr Glu Val Asp | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Ile Leu Glu Tyr Ile Gly Phe Ala Tyr Tyr Leu Asn Gly Asp Val Lys | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Thr Ala Leu Glu Trp Thr Gln Arg Leu Leu Ser Val Asp Pro Lys His | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Val Arg Ala Arg Gly Asn Ile Pro His Tyr Gln Lys Thr Ile Ala Glu | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Gln Glu Ala Glu Leu Lys Lys Gln Gln Arg Gly Glu Thr Ser Asp Glu | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gln Asp Tyr Glu Leu Ser Glu Tyr Ala Lys | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Glu Arg Lys Val Tyr Glu Ser Leu Cys Arg Gly Glu Met Glu Ile Pro | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| His Glu Ile Thr Lys Arg Leu Lys Cys Trp Tyr Val Thr Asp Thr His | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Pro Phe Leu Lys Leu Ala Pro Ile Lys Val Glu Gln Met Tyr Val Lys | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Pro Asp Ile Phe Met Phe His Glu Val Met Thr Asp Asp Glu Ile Glu | | | |

10/22

340 345 350
Phe Ile Lys Lys Arg Ala Lys Pro Arg Phe Lys Arg Ala Val Val His
355 360 365
Asp Pro Lys Thr Gly Glu Leu Thr Pro Ala His Tyr Arg Ile Ser Lys
370 375 380
Ser Ser Trp Leu Arg Asp Glu Glu Ser Pro Val Ile Ala Arg Ile Thr
385 390 395 400
Gln Arg Val Thr Asp Met Thr Gly Leu Ser Met Leu His Ala Glu Glu
405 410 415
Leu Gln Val Val Asn Tyr Gly Ile Gly Gly His Tyr Glu Pro His Phe
420 425 430
Asp Phe Ala Arg Lys Arg Glu Asn Pro Phe Thr Lys Phe Gly Gly Asn
435 440 445
Arg Ile Ala Thr Val Leu Phe Tyr Met Ser Asp Val Ala Gln Gly Gly
450 455 460
Ala Thr Val Phe Thr Glu Leu Gly Leu Ser Leu Phe Pro Ile Lys Arg
465 470 475 480
Ala Ala Ala Phe Trp Leu Asn Leu His Ala Ser Gly Glu Gly Asp Leu
485 490 495
Ala Thr Arg His Ala Ala Cys Pro Val Leu Arg Gly Ser Lys Trp Val
500 505 510
Ser Asn Lys Trp Ile His Gln Gly Gly Gln Glu Leu Leu Arg Pro Cys
515 520 525
Asp Leu Glu Tyr Gln Glu Glu Gly Ile Ile Arg Lys Ile Pro Arg Pro
530 535 540
Val Pro Lys Thr Ser Arg
545 550

11/22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 3

tcgtaactgc ctacacgttt gc

22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 4

agacgtgaac ctggctggct

20

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

12/22

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 5

tttagactcg agcct

15

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 6

tacagttctt atctagacgt gaacc

25

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

13/22

<400> 7

gacataatat gtgacgctcg agaattagac tgc

33

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 8

ggatccagac atgataagat ac

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 9

gatcataatc agccatacca c

21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 10

gatcccccta gaatcccaaa ac

22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 11

cttagcgacg tgttcacttt gc

22

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 12

agatctagtc gaatttcgac tctgcg

27

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 13

cccgatgata agacgactat g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

16/22

<400> 14

ccaggttcac gtctaaataa g

21

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 15

agatctcatg acaacagtac cgaaatc

27

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 16

taacagacca ctaaaatgaa g

21

17/22

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 17

ctcgagtagc ttttccatca tcaatgt

27

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 18

tctagaagat ctggtacggt tcgtaaagtt cac

33

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 19

gtctgttatg tgaccaatcg g

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 20

acagaccact aaaatgaagc c

21

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 21

ctcgagcctg gctggctgct tgtgcaa

27

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 22

tgttccacgg aaacactggt g

21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 23

catcctccag aactgtgtag g

21

<210> 24

20/22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 24

cacaacgtct atatcatggc cg

22

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 25

atgttgtggc ggatcttgaa g

21

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 26

tncargtngc naaytaygg

19

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 27

cncncncngc nswnacrtc

19

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 28

gaggacggtg gctattctgt tgccg

25

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<213> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 29

ggcatagggg gacactacga accgc

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04906

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01K67/04, C12N9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01K67/04, C12N9/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|---------------------------------------|
| Y | Masafumi YAMAO, et al., "Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus", Genes and Development, (1999), Vol.13, pages 511 to 516 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | Toshiki TAMURA, et al., "Germline transformation of the silkworm <i>Bombyx mori</i> L. using a piggyBac transposon-derived vector", Nature Biotechnology, January, 2000, Vol.18, No.1, pages 81 to 84 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | JP 08-023979 B (Terumo Corporation), 30 January, 1996 (30.01.96) (Family: none) | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | WO 97/038121 A1 (Fibrogen, Inc.), 16 October, 1997 (16.10.97), & JP 2000-508532 A & EP 904399 A1 & US 5928922 A | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
03 September, 2001 (03.09.01)Date of mailing of the international search report
18 September, 2001 (18.09.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04906

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|---------------------------------------|
| Y | Tarja HELAAKOSKI, et al., "Cloning, baculovirus expression, and characterization of a second mouse prolyl 4-hydroxylase α -subunit isoform: Formation of an $\alpha_2\beta_2$ tetramer with the protein disulfide-isomerase/ β subunit", Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., (1995), Vol.92, pages 4427 to 4431 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | I. HOPKINSON, et al., "The complete cDNA derived sequence of the rat prolyl 4-hydroxylase α subunit", Gene, (1994), Vol.194, pages 391 to 392 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| PX | Katsunori YOSHISATO, "Kumikae-tai Konchuu riyou e no Teigen", Sanshi Konchuu Ken Shiryou, March, 2001, Vol.28, pages 93 to 95 | 1-24 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01K67/04, C12N9/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/09, A01K67/04, C12N9/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq MEDLINE (STN) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|---------------------------------------|
| Y | Masafumi YAMA0. et. al. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. GENES and DEVELOPMENT 1999, Vol.13, pages 511-516 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | TAMURA Toshiki. et. al. Germline transformation of the silkworm <i>Bombyx mori</i> L. using a <i>piggyBac</i> transposon-derived vector. NATURE BIOTECHNOLOGY January 2000, Vol.18, No.1, pages 81-84 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.09.01

国際調査報告の発送日

18.09.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|---------------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | JP. 08-023979 B (テルモ株式会社) 30.1月.1996 (30.01.96) ファミリーなし | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | WO 97/038121 A1 (FIBROGEN, INC.) 16.10月.1997 (16.10.97) & JP 2000-508532 A & EP 904399 A1 & US 5928922 A | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | Tarja HELAAKOSKI. et. al. Cloning, baculovirus expression, and characterization of a second mouse prolyl 4-hydroxylase α -subunit isoform: Formation of an $\alpha_2\beta_2$ tetramer with the protein disulfide-isomerase/ β subunit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, Vol. 92, pages 4427-4431 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| Y | I. HOPKINSON. et. al., The complete cDNA derived sequence of the rat prolyl 4-hydroxylase α subunit. Gene 1994, Vol. 194, pages 391-392 | 1, 2, 4, 5, 7-14, 16-19, 21, 22 |
| P X | 吉里 勝利 組換え体昆虫利用への提言. 蚕糸昆虫研資料 3月.2001, Vol. 28, pages 93-95 | 1-24 |